Detección del gen *bla*_{VIM-2} en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasa aisladas en una unidad de cuidados intensivos en Ciudad Bolívar, Venezuela

Armando Guevara, Jacobus de Waard y María Araque

Universidad de Oriente,
Núcleo Bolívar, Venezuela
Escuela de Ciencias de la Salud
Dr. Francisco Batistini,
Departamento de Parasitología y
Microbiología (AG)
Universidad de los Andes,
Mérida, Venezuela.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Laboratorio de Microbiología
Molecular (AG, MA)
Instituto de Biomedicina,
Caracas, Venezuela
Laboratorio de Tuberculosis (JdW).

Recibido: 30 de junio de 2008
Aceptado: 7 de abril de 2009

Correspondencia a:
María Araque
araquemc@ula.ve

*bla*_{VIM-2} gene detection in metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in an Intensive Care Unit in Ciudad Bolívar, Venezuela

Ten *Pseudomonas aeruginosa* strains with resistance to broad-spectrum cephalosporin and carbapenems were studied to determine the presence of genes that mediate the production of metallo- β -lactamases. These strains were isolated from patients with nosocomial infection at the Intensive Care Unit of the Complejo Hospitalario "Ruiz y Paéz" of Ciudad Bolívar, Bolívar State, Venezuela, from 2003 to 2006. In all isolates a metallo-enzyme activity was detected by using the double disk synergism test. PCR amplification of genes encoding the families IMP, VIM and SPM metallo- β -lactamases showed the presence of a *bla*_{VIM} gene in all strains studied. DNA sequencing revealed that all isolates showed the presence of *bla*_{VIM-2}. These results suggest that it is necessary to keep these strains under epidemiologic surveillance, establish laboratory strategies for opportune detection and the implementation of new policies to ensure the appropriate use of antibiotics in this institution.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, metallo- β -lactamases, *bla*_{VIM-2} gene, nosocomial infections.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, metalo β -lactamasas, gen *bla*_{VIM-2}, infección nosocomial.

Introducción

El surgimiento de los mecanismos de resistencia a los agentes antimicrobianos, en particular a los β -lactámicos de amplio espectro, hace difícil el manejo de los procesos infecciosos, especialmente los causados por *Pseudomonas aeruginosa*. En consecuencia, las opciones terapéuticas disponibles para tratar las infecciones por *P. aeruginosa* resistente son muy limitadas y la decisión en la aplicación de un tratamiento apropiado muchas veces no se realiza con la celeridad que el caso amerita, por lo que se favorece el aumento de la morbilidad y la mortalidad en pacientes con infecciones por este patógeno¹.

La producción de metalo-enzimas es uno de los mecanismos principales involucrados en la resistencia de *P. aeruginosa* a los β -lactámicos de amplio espectro². Estas enzimas, presentes de forma natural en algunas especies de bacilos gramnegativos ambientales, tienen la capacidad de hidrolizar a todas las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos^{2,3}. De acuerdo con la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para las metalo β -lactamasas y las características estructurales de cada enzima, éstas han sido divididas en tres subclases en el grupo B de

la clasificación molecular de Ambler. La subclase B1 agrupa a las enzimas inducibles o asociadas a plásmidos. En este grupo se encuentran las de tipo IMP, VIM, SPM, GIM y SIM. Las subclases B2 y B3 agrupan las metalo β -lactamasas cromosómicas derivadas de *Aeromonas* spp, *Serratia fonticola* y *Stenotrophomonas maltophilia*³.

En *P. aeruginosa* se han detectado cuatro de los cinco tipos de metalo β -lactamasas que constituyen la subclase B1 (IMP, VIM, SPM y GIM)³. Los genes que codifican para estas enzimas se encuentran asociados a transposones e integrones, los cuales están frecuentemente localizados en plásmidos grandes (80-120 kb), donde usualmente se transportan otros determinantes de resistencia^{3,4}.

Las metalo-enzimas pertenecientes a la familia IMP y VIM son las más frecuentes y diseminadas en todo el mundo. En Venezuela, se reportaron por primera vez cepas de *P. aeruginosa* productoras de VIM-2 en el año 2004⁵. Desde entonces, en varios hospitales venezolanos se han aislado cepas de *P. aeruginosa* con un perfil fenotípico compatible con la producción de metalo β -lactamasas, pero en la mayoría de los casos no se ha comprobado el mecanismo genético involucrado.

Por ello en este estudio se analizaron 10 cepas de *P. aeruginosa* resistentes a cefalosporinas de amplio espectro

y a carbapenémicos, aisladas de pacientes hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez" en Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela, con el fin de determinar la presencia de genes que median la producción de metalo β -lactamasas.

Material y Métodos

Cepas bacterianas. Se analizó una colección de 10 cepas de *P. aeruginosa* con un patrón inusual de resistencia a cefalosporinas de amplio espectro y carbapenémicos, aisladas de pacientes hospitalizados en la UCI del Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez" en Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela, durante el periodo 2003 al 2006.

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Los fenotipos de susceptibilidad fueron determinados utilizando el método de difusión con discos de acuerdo a los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute⁶. Los antibacterianos utilizados fueron (BBL): piperacilina (100 μ g), piperacilina/tazobactam (100/10 μ g), ceftazidima (30 μ g), cefoperazona (75 μ g), cefepima (30 μ g), imipenem (10 μ g), meropenem (10 μ g), aztreonam (30 μ g), amikacina (30 μ g), gentamicina (10 μ g) y ciprofloxacina (5 μ g). La cepa *P. aeruginosa* ATCC 25927 se utilizó como control para las pruebas de susceptibilidad.

Detección fenotípica de las metalo β -lactamasas. Esta prueba se realizó mediante la técnica de sinergismo del doble disco (DDST), utilizando discos de imipenem (10 μ g), meropenem (10 μ g) y ácido etilendiaminotetracético-mercaptopacético de sodio (EDTA-SMA) (Fluka). Los discos de EDTA-SMA fueron preparados de acuerdo a lo descrito por Lee y cols⁷. Se impregnaron discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro con 10 ml de una solución que contenía 4 volúmenes de EDTA (0,5 M) y 6 volúmenes de SMA (300 mg/ml), obteniéndose una concentración final en cada disco de aproximadamente 750 μ g de EDTA y 2 mg de SMA. Una vez elaborados los discos, se dejaron secar a temperatura ambiente y fueron conservados a -20 °C.

La detección de las metalo β -lactamasas se realizó inoculando placas de agar Mueller-Hinton (HiMedia) con suspensiones de las cepas ajustadas a una turbidez equivalente al 0,5 de McFarland. Luego, se colocó el disco de EDTA-SMA en el centro de la placa y a ambos lados, a una distancia de 15 mm, se ubicaron los discos de imipenem y meropenem. Las placas fueron incubadas a 35 °C en aerobiosis durante 18-24 horas y posteriormente se procedió a la lectura e interpretación de la prueba. Se consideró la prueba positiva para la producción de una metalo β -lactamasa, cuando fue visible el incremento del halo de inhibición entre el β -lactámico (meropenem y/o imipenem) y el disco de EDTA-SMA⁷.

Como control de los discos de EDTA-SMA y de las

pruebas de detección fenotípica de las metalo-enzimas, se utilizó la cepa *P. aeruginosa* 77297 productora de metalo β -lactamasas de tipo VIM.

Extracción del ADN cromosomal de las cepas de *P. aeruginosa*. A partir de un cultivo de 18 horas en agar tripticasa soya (HiMedia) se tomaron varias colonias, se resuspendieron en 200 μ l de TE (10mM Tris, 1 mM EDTA) y se sometieron a ebullición en baño de María por 10 minutos. Posteriormente, por centrifugación, se separó el sobrenadante conteniendo el ADN bacteriano, el cual se transfirió a tubos Eppendorf y se almacenó a -20 °C⁸.

Detección por RPC de genes que codifican para las metalo β -lactamasas. La presencia de los genes que codifican para las metalo β -lactamasas de las familias SPM, VIM e IMP, se realizó a través de la reacción de polimerasa en cadena (RPC) utilizando los partidores mostrados en la Tabla 1. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l y la mezcla estuvo compuesta por 5 μ l de cada partidor (5 pmol/ml); 20,5 ml agua bidestilada ultrapura; 25 μ l LPU (Fundaim) y 2,5 ml de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las descritas anteriormente⁸⁻¹⁰. Los productos obtenidos de las amplificaciones por RPC fueron observados en corridas electroforéticas en geles de agarosa al 1,5% (Promega), teñidos con bromuro de etidio (Sigma) y fotografiados con una cámara digital PowerShot A700 (Canon). Como marcador del tamaño molecular se utilizó Ladder 50 pb (Promega).

Secuenciación de los productos amplificados. Los productos de la RPC que resultaron positivos para la detección de genes que codifican para las metalo β -lactamasas se purificaron utilizando el Wizard[®] DNA Clean-Up System (Promega). Posteriormente, las secuencias nucleotídicas fueron determinadas por el Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSAAN) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas-Venezuela, mediante electroforesis capilar en un secuenciador de ácidos nucleicos modelo ABI 3130XL (Applied Biosystems[®]), utilizando los mismos

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados como partidores en los ensayos de amplificación por RPC

Iniciador	Secuencia	Gen amplificado	Tamaño del producto esperado	Referencia
SPM F SPM R	5' CCT ACA ATC TAA CGG CGA CC-3' 5' TCG CCG TGT CCA GGT ATA AC-3'	<i>bla_{SPM}</i>	786 pb	8
IMP F IMP R	5'-CTA CCG CAG CAG AGT CTT TG-3' 5'-AAC CAG TTT TGC CTT ACC AT-3'	<i>bla_{IMP}</i>	587 pb	9
VIM F VIM R	5' AGT GGT GAG TAT CCG ACA G-3' 5' ATG AAA GTG CGT GGA GAC-3'	<i>bla_{VIM}</i>	261 pb	10

Tabla 2. Datos clínico-epidemiológicos de los pacientes con infección por *Pseudomonas aeruginosa*

Año de aislamiento	Nº de cepa	Tipo de muestra	Edad (años)	Sexo	Diagnóstico	Tratamiento antibiótico
2003	807B	Aspirado traqueobronquial	49	F	Polirradiculoneuropatía (Síndrome Guillain-Barré) Insuficiencia respiratoria Aguda	CAZ-ATM-IMP-CIP-AMK
2003	1156A	Secreción de yeyunostomía	48	M†	Traumatismo abdominal por arma de fuego	CTX-IMP-CIP-MXF-AMK-MTZ
2003	1182A	Secreción intraabdominal	35	M†	Traumatismo abdominal por arma de fuego Lesión de páncreas grado V	CTX-IMP-CIP-LVX-AMK-MTZ
2003	1283A	Secreción intraabdominal	37	M	Sepsis secundaria a absceso hepático	CTX-CFP/SULB-IMP-CIP-AMK-MTZ
2004	9A	Secreción intraabdominal	40	M	Traumatismo abdominal por arma blanca.	CTX-CAZ-CIP-MXF-AMK-MTZ
2004	391A	Aspirado traqueobronquial	2	F	Politraumatismos generalizados y traumatismo craneoencefálico	CTX-CRO-ATM-CIP-AMK
2006	6B	Aspirado traqueobronquial	36	M	Traumatismo craneoencefálico	OXA-CTX-ATM-CHL-AMK
2006	393B	Aspirado traqueobronquial	55	F	Sepsis. Insuficiencia respiratoria aguda	CEF-PIP/TAZ-MXF-AMK-GEN
2006	1056H	Sangre	26	M	Politraumatismos generalizados y traumatismo craneoencefálico	CEF-CAZ-CRO-PIP/TAZ-CIP-AMK-GEN
2006	1100H	Sangre	12	M	Polirradiculoneuropatía (Síndrome Guillain-Barré) Insuficiencia respiratoria aguda	CEF-CAZ-CRO-PIP/TAZ-CIP-AMK-GEN

†: pacientes fallecidos; M: masculino; F: femenino; OXA: oxacilina; CEF: cefalotina; CRO: ceftriaxona; CTX: cefotaxima; CFP/SULB: cefoperazona/sulbactam; PIP/TAZ: piperacilina/tazobactam; ATM: aztreonam; IMP: imipenem; CIP: ciprofloxacina; LVX: levofloxacina; MXF: moxifloxacina; AMK: amikacina; GEN: gentamicina; CHL: cloranfenicol; MTZ: metronidazol.

partidores que en la RPC. Las secuencias nucleotídicas resultantes fueron analizadas mediante el uso del programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y comparadas con las secuencias génicas incluidas en la base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Resultados

Se evaluó un total de 10 cepas de *P. aeruginosa*, resistentes a las cefalosporinas de amplio espectro y a los carbapenémicos, aisladas de muestras clínicas de pacientes hospitalizados en la UCI. Los pacientes tenían una edad promedio de 34 años (rango: 2-55 años), el 30% correspondió al sexo femenino y 70% al masculino. Las cepas fueron recuperadas de cuatro muestras de secreción intra-abdominal, tres de aspirado traqueobronquial, dos de sangre y una de la secreción del orificio de yeyunostomía. Todos los pacientes fueron tratados con la combinación de diferentes grupos de antibacterianos, siendo común el uso de β -lactámicos de amplio espectro y aminoglucósidos. En tres pacientes se incluyó imipenem en el esquema terapéutico. Dos de ellos fallecieron (Tabla 2).

En la Tabla 3 se muestran las características fenotípicas de las cepas estudiadas. La mayoría de las cepas fueron resistentes a los β -lactámicos, sensibles al aztreonam y

con resistencia asociada a aminoglucósidos (gentamicina y amikacina) y a ciprofloxacina. Este fenotipo fue el más frecuente y constituyó el patrón A. La cepa 1100H constituyó el patrón B y se diferenció del A por demostrar sensibilidad intermedia a gentamicina y ciprofloxacina. Independientemente del patrón fenotípico de resistencia, todas las cepas produjeron metalo β -lactamasas de acuerdo a la prueba DDST. Este resultado fue confirmado cuando se utilizaron los ensayos para la detección genética de las principales familias de metalo-enzimas. Las 10 cepas con fenotipos compatibles con la producción de metalo β -lactamasas amplificaron solamente con los iniciadores específicos para la detección del gen *bla*_{VIM} (Tabla 3 y Figura 1). La secuenciación de los amplicones permitió identificar la presencia del gen *bla*_{VIM-2} en todas las cepas estudiadas.

Discusión

La prevalencia de cepas de *P. aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas en áreas hospitalarias como las UCI, se ha incrementado en los últimos años en todo el mundo¹¹⁻¹³. Las cepas de *P. aeruginosa* que se analizaron en este estudio, fueron aisladas en pacientes con diagnósticos diferentes que posteriormente se complicaron con una infección nosocomial en la UCI del Complejo

Tabla 3. Características fenotípicas de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes hospitalizados en la UCI del Complejo Hospitalario "Ruiz y Paéz" de Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela

Nº de cepa	Perfil de susceptibilidad	Patrón	DDST	Detección por RPC de genes que codifican para metalo β -lactamasas		
				<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{SPM}
1156A	PIP ^R TZP ^R CAZ ^R CFP ^R FEP ^R IPM ^R MEM ^R ATM ^S GEN ^R AMK ^R CIP ^R	A	+	+	-	-
1182A	PIP ^R TZP ^R CAZ ^R CFP ^R FEP ^R IPM ^R MEM ^R ATM ^S GEN ^R AMK ^R CIP ^R	A	+	+	-	-
9A	PIP ^R TZP ^R CAZ ^R CFP ^R FEP ^R IPM ^R MEM ^R ATM ^S GEN ^R AMK ^R CIP ^R	A	+	+	-	-
391A	PIP ^R TZP ^R CAZ ^R CFP ^R FEP ^R IPM ^R MEM ^R ATM ^S GEN ^R AMK ^R CIP ^R	A	+	+	-	-
6B	PIP ^R TZP ^R CAZ ^R CFP ^R FEP ^R IPM ^R MEM ^R ATM ^S GEN ^R AMK ^R CIP ^R	A	+	+	-	-
393B	PIP ^R TZP ^R CAZ ^R CFP ^R FEP ^R IPM ^R MEM ^R ATM ^S GEN ^R AMK ^R CIP ^R	A	+	+	-	-
1056H	PIP ^R TZP ^R CAZ ^R CFP ^R FEP ^R IPM ^R MEM ^R ATM ^S GEN ^R AMK ^R CIP ^R	A	+	+	-	-
807B	PIP ^R TZP ^R CAZ ^R CFP ^R FEP ^R IPM ^R MEM ^R ATM ^S GEN ^R AMK ^R CIP ^R	A	+	+	-	-
1283A	PIP ^R TZP ^R CAZ ^R CFP ^R FEP ^R IPM ^R MEM ^R ATM ^S GEN ^R AMK ^R CIP ^R	A	+	+	-	-
1100H	PIP ^R TZP ^R CAZ ^R CFP ^R FEP ^R IPM ^R MEM ^R ATM ^S GEN ^I AMK ^R CIP ^I	B	+	+	-	-

PIP piperacilina; TZP piperacilina/tazobactam; CAZ ceftazidima; CFP cefoperazona; FEP cefepima IPM imipenem; MEM meropenem; ATM aztreonam; GEN gentamicina; AMK amikacina; CIP ciprofloxacina; S sensible; I intermedio; R resistente; DDST: Prueba del sinergismo del doble disco (EDTA-SMA)

Hospitalario "Ruiz y Páez" en Ciudad Bolívar. Al realizar las pruebas de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos se observó que todos los aislados mostraron un perfil de sensibilidad compatible con la producción de una metalo β -lactamasa. La detección de este tipo de enzimas mediante los ensayos DDST permitió confirmar que todas las cepas de *P. aeruginosa* aisladas producían una metalo-enzima.

En todos los aislados se pudo observar que la resistencia a los β -lactámicos de amplio espectro estuvo siempre asociada a la presencia de otros marcadores tales como: gentamicina, amikacina y ciprofloxacina. Se ha confirmado que las metalo β -lactamasas de la subclase B1, son codificadas por genes localizados en transposones o integrones que se encuentran en plásmidos transferibles, donde, por lo general, co-existen otros determinantes de resistencia^{3,4,14}. La presencia de genes de resistencia adicionales que median la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, bombas de expulsión, alteraciones de la permeabilidad de la pared celular entre otros, son mecanismos que pueden expresarse simultáneamente en *P. aeruginosa*^{15,16}, generando así diferentes complejos fenotípicos de multi-resistencia como los observados en este estudio.

Aztreonam no es afectado por la acción de las metalo β -lactamasas y representa una opción terapéutica en el tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa* productoras de metalo-enzimas¹¹. Las cepas estudiadas conservaron la sensibilidad a este antibacteriano. Las metalo β -lactamasas de tipo IMP fueron las primeras

Figura 1. Gel electroforético representativo de la amplificación por RPC del gen *bla*_{VIM} en las cepas de *P. aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas. M. Marcador de tamaño molecular Ladder 50 pb. 1. Control negativo. 2. Control positivo *P. aeruginosa* 77297. Canales 3 al 10 cepas de *P. aeruginosa*. 807B, 1156A, 1182A, 1283A, 9 A, 391A, 6B, 393B.

en ser identificadas en bacterias gramnegativas, son las más frecuentes y diseminadas en todo el mundo. A éstas le siguen en importancia las pertenecientes a la familia VIM, cuyas variantes se han detectado desde 1997 en varios países de Europa^{3,11,14}. En Venezuela, la metalo β -lactamasa VIM-2 fue descrita en el año 2004 en tres cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico en un hospital de Caracas, en el marco del programa internacional de vigilancia SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program)⁵.

El presente trabajo representa el primer reporte donde se confirma la presencia de cepas de *P. aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas de tipo VIM-2 aisladas de pacientes internados en un hospital público en la región sur oriental del país.

Es importante destacar que en este estudio también se investigó la presencia de otras metalo β -lactamasas, como las de la familia IMP y SPM, resultando negativo. La primera de éstas ha aumentado su prevalencia en América en los últimos años y las metalo β -lactamasas SPM son prevalentes en el norte de Brasil¹⁷. Este último dato es de particular interés epidemiológico para el estado Bolívar, debido a que en el Complejo Hospitalario “Ruiz y Páez” en Ciudad Bolívar se atienden pacientes provenientes de la parte norte del Brasil, zona fronteriza con el estado Bolívar. Por lo tanto, no es de sorprender que en algún momento se aislen en este hospital cepas de *P. aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas de tipo SPM con un alto riesgo de diseminarse, de no tomarse medidas de vigilancia, control y prevención precoz contra este patógeno.

La evolución de los genes que median la resistencia a los antimicrobianos β -lactámicos de amplio espectro en *P. aeruginosa*, está particularmente relacionada con el uso de imipenem y a la aparición de brotes o epidemias en áreas específicas del ambiente hospitalario^{12,18,19}. En Venezuela, el listado oficial de medicamentos para el uso hospitalario sólo incluye imipenem como único representante de los carbapenémicos²⁰, lo que favorece su prescripción intensa en lugar de otras alternativas terapéuticas efectivas. Es probable que las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a cefalosporinas y carbapenémicos que inicialmente fueron aisladas en el año 2003, hayan sido seleccionadas por el uso intenso del imipenem, permitiendo de esta manera la dispersión y circulación de clones productores de metalo β -lactamasas tipo VIM-2 durante los años 2004 al 2006. Estudios posteriores incluirán otras técnicas moleculares que determinarán el origen y la relación clonal de las cepas estudiadas.

En conclusión, los resultados de este estudio confirmaron que en la UCI del Complejo Hospitalario “Ruiz y Páez” en Ciudad Bolívar, circulan cepas de *P. aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas de tipo VIM-2. Por consiguiente, es necesario mantener a estas cepas bajo vigilancia epidemiológica, establecer estrategias de laboratorio para su detección oportuna, e implementar nuevas políticas que aseguren el uso adecuado de los antimicrobianos en esta institución. El reconocimiento de los factores asociados con el incremento de la resistencia y el estudio de los mecanismos genéticos involucrados conducirán a la aplicación de conductas que reducirán la selección y diseminación de cepas de *P. aeruginosa* productoras de metalo β -lactamasas.

Resumen

Se estudiaron 10 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia a cefalosporinas y carbapenémicos con el objeto de determinar la presencia de genes que median la producción de metalo β -lactamasas. Estas cepas se aislaron de pacientes con infección nosocomial hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Complejo Hospitalario “Ruiz y Páez” de Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela, durante el período 2003 – 2006. En todas las cepas se detectó la actividad de una metaloenzima, mediante la prueba del sinergismo del doble disco. La amplificación por la reacción de polimerasa en cadena de los genes que codifican para las metalo β -lactamasas de las familias IMP, VIM y SPM, y su posterior secuenciación, permitió confirmar la presencia de metalo β -lactamasas de tipo VIM-2. Estos resultados sugieren que es necesario mantener bajo vigilancia epidemiológica a estas cepas, establecer estrategias de laboratorio para su detección oportuna e implementar nuevas políticas que aseguren el uso adecuado de los antibacterianos en esta institución.

Referencias

- 1.- McGowan J E. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. Am J Med 2006; 119 (6 Suppl 1): S29-S36.
- 2.- Rossolini G M. Acquired metallo- β -lactamasas: an increasing clinical threat. Clin Infect Dis 2005; 41: 1557-8.
- 3.- Walsh T R, Toleman M A, Poirrel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamasas: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005; 18: 306-25.
- 4.- Kimura S, Alba J, Shiroto K, Sano R, Niki Y, Maesaki S, et al. Clonal diversity of metallo- β -lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in geographically diverse regions of Japan. J Clin Microbiol 2005; 43: 458-61.
- 5.- Mendes R E, Castanheira M, García P, Guzmán M, Toleman M A, Walsh T R, et al. First isolation of *bla* (VIM-2) in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1433-4.
- 6.- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth informational supplement. M100-S16. Wayne (PA), USA: 2006.
- 7.- Lee K, Lim Y S, Yong D, Yum J H, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2003; 41: 4623-9.
- 8.- Gales A C, Menezes L C, Silbert S, Sader H S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 699-702.
- 9.- Senda K, Arakawa Y, Ichihama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, et al. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla*IMP) in gram-negative rods resistant to

- broad-spectrum β -lactams. J Clin Microbiol 1996; 34: 2909-13.
- 10.- Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou M F, Babini GS, Douboyas J, et al. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. J Clin Microbiol 2000; 38: 1290-2.
 - 11.- Poirel L, Pitout J D, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. Future Microbiol 2007; 2: 501-12.
 - 12.- Fujimura S, Nakano Y, Sato T, Shirahata K, Watanabe A. Relationship between the usage of carbapenem antibiotics and the incidence of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Chemother 2007; 13: 147-50.
 - 13.- Corvec S, Poirel L, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Nordmann P. Long-term evolution of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-enzyme. J Hosp Infect 2008; 68: 73-82.
 - 14.- Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Cantón R, Cauda R, Docquier J, et al. Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. Int J Antimicrob Agents 2007; 29: 380-8.
 - 15.- Hocquet D, Berthelot P, Roussel-Delvallez M, Favre R, Jeannot K, Bajolet O, et al. *Pseudomonas aeruginosa* may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 3531-6.
 - 16.- Nordmann P, Naas T, Fortineau N, Poirel L. Superbugs in the coming new decade; multi-drug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. Curr Opin Microbiol 2007; 10(5): 436-40.
 - 17.- Viana Vieira V, Lourenço da Fonseca E, Paulo Vincente A C. Metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 937.
 - 18.- Cao B, Wang H, Sun H, Zhu Y, Chen M. Risk factors and clinical outcomes of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Hosp Infect 2004; 57: 112-18.
 - 19.- Walsh F, Bracher S, Turner P, Amyes S. Preferential selection of IMP and VIM metallo- β -lactamases by imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. Chemotherapy 2007; 53: 407-9.
 - 20.- Ministerio del Poder Popular para la Salud. Comité Terapéutico Nacional. Formulario terapéutico nacional. Disponible en: http://www.sefar.gob.ve/index_1/manual_terap_1.htm [Acceso 2 de febrero de 2008].